

模拟干旱胁迫下蜡杨梅幼苗根系响应 5-羟色胺的转录组分析

焦云^{1,2}, 贾慧敏³, 房聪玲⁴, 柴春燕⁴

¹宁波市特色园艺作物品质调控与抗性育种重点实验室, 浙江宁波 315040; ²宁波市农业科学研究院林业研究所, 浙江宁波 315040;

³江西农业大学农学院, 南昌 330045; ⁴慈溪市林特技术推广中心, 浙江慈溪 315300

摘要: 植物生长调节剂5-羟色胺(5-HT, 5-hydroxy-tryptamine)已应用于农业生产, 以提升作物抗旱性, 然而其转录水平的分子机制尚不清楚。本研究通过转录组测序、内源激素水平和抗氧化酶活性的综合评价, 探讨模拟干旱胁迫下蜡杨梅幼苗响应外源5-羟色胺的生理和分子影响机制。结果表明, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的5-HT处理显著提高了蜡杨梅根系中脱落酸和茉莉酸含量, 而100 $\mu\text{mol/L}$ 的5-HT处理的结果则刚好相反。50 $\mu\text{mol/L}$ 的5-HT处理诱导丙二醛含量和超氧化物歧化酶活性显著升高, 而过氧化氢含量则显著降低。基于上述两种浓度水平的5-羟色胺处理基因集富集分析结果表明, 差异表达基因集主要包括抗氧化酶活性、氧化还原酶活性、生长素和赤霉素介导信号传导、细胞壁生物合成、木聚糖生物合成、果胶代谢、次生代谢物生物合成、苯丙烷和半乳糖醛酸代谢等。与抗氧化酶活性及激素代谢相关的差异表达基因主要为PER、LAC、DHAR和PIN等。通过加权基因共表达网络分析发现8个共表达基因模块与5-羟色胺及干旱胁迫显著相关, 其中枢纽基因KAB1218346.1(LOX3)、KAB1219593.1(WRKY53)和KAB1217691.1(CZF1)主要参与激素代谢和转录调控, 上述关键基因及其分子调控机制将是今后研究的重要对象。

关键词: 5-羟色胺; 模拟干旱胁迫; 蜡杨梅; 转录组

Transcriptomic Analysis in *Morella cerifera* Seedlings Root under Simulated Drought Stress in Response to 5-hydroxy-tryptamine

JIAO Yun^{1,2}, JIA Huimin³, FANG Congling⁴, CHAI Chunyan⁴

¹Ningbo Key Laboratory of Characteristic Horticultural Crops in Quality Adjustment and Resistance Breeding, Ningbo 315040, Zhejiang;

²Institute of Forestry, Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo 315040, Zhejiang;

³College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045; ⁴Cixi Forestry Technology Extension Center, Cixi 315300, Zhejiang

Abstract: The plant growth regulator 5-hydroxy-tryptamine (5-HT) has been used in agricultural production to improve crop drought resistance. The underlying molecular mechanisms of its transcriptional response are largely unknown. In this study, the simulated drought stress-related physiological and molecular mechanisms of exogenous 5-HT on *Morella cerifera* seedlings were elucidated, including transcriptome sequencing and the evaluation of endogenous hormone levels and antioxidant enzyme activity. The results demonstrated that abscisic acid (ABA) and jasmonic acid (JA) content in *Morella cerifera* fibrous roots significantly increased following 50 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT treatments but decreased in 100 $\mu\text{mol/L}$ treatments. Both the malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activity were significantly increased but hydrogen peroxide (H_2O_2) content decreased following 50 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT treatments. Based on gene set enrichment

收稿日期: 2023-11-05 网络出版日期: 2024-05-09

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231105001>

第一作者研究方向为果树分子遗传育种与栽培技术, E-mail: jydyx@163.com

基金项目: 宁波市现代种业专项(2021Z008)

Foundation project: The Modern Seed Industry Special Project in Ningbo(2021Z008)

analysis (GSEA), two-concentration levels 5-HT treatments were investigated. The differential gene set terms primarily included antioxidant activity, oxidoreductase activity, auxin and gibberellin-mediated signaling, cell wall biosynthetic, phospholipid translocation, xylan biosynthetic, pectin metabolic, secondary metabolite biosynthetic, phenylpropanoid metabolic and galacturonan metabolic process. The differentially expressed genes (DEGs) related to antioxidant enzyme activity and hormone metabolism were mainly *PER*, *LAC*, *DHAR* and *PIN*. Eight sets of co-expressed gene modules were significantly correlated with 5-HT and drought stress by the weighted gene co-expression network analysis (WGCNA). The hub genes *KAB1218346.1 (LOX3)*, *KAB1219593.1 (WRKY53)*, *KAB1217691.1 (CZF1)* were primarily associated with hormone metabolism and regulation of transcription. These key genes and their molecular regulatory mechanisms will be important targets for future research.

Key words: 5-hydroxy-tryptamine; simulated drought stress; *Morella cerifera*; transcriptomics

干旱是影响全球作物生长及产量最重要的非生物胁迫之一,常造成严重的经济损失^[1-2]。由于作物根系缺水导致细胞内积累大量的活性氧,制约其正常生理代谢过程,最终导致细胞死亡。因此,提升作物的耐旱性是迫切需要解决的重要问题。

植物生长调节剂常用于农业生产中调节作物生长及抗逆性,研究其作用机制有助于制定提高作物生长及抗逆性的综合管理策略。5-羟色胺(5-HT, 5-hydroxy-tryptamine)是一种由色氨酸衍生的吲哚胺类神经递质,广泛存在于包括植物、人类和各种动物在内的生物体中^[3-4]。5-羟色胺参与许多植物生理调节过程,如器官发育、衰老和抗逆防御反应等^[5-6]。前期研究表明,外源5-羟色胺可提高油菜幼苗清除过氧化氢(H₂O₂)的能力,促进渗透调节物质积累,增强抗氧化酶活性,有效缓解油菜幼苗干旱胁迫压力和抵御低温胁迫^[7-8];5-羟色胺仅在特定浓度水平(0.03 g/L)可将其抗氧化能力发挥至最大,浓度水平提升(0.04 g/L)将导致油菜幼苗的成活率下降。类似地,在拟南芥中也发现侧根发育对外源5-羟色胺的浓度水平具有高度依赖性^[9]。由此可见,通过5-羟色胺缓解环境胁迫应激会受到其施用浓度剂量的制约。另外,5-羟色胺是植物中重要的信号分子之一,参与植物抗氧化、激素调控和活性氧信号传导^[10-11]。Wan等^[12]研究发现,5-羟色胺会诱导逆境胁迫下的拟南芥根系中次生代谢物生物合成、植物与病原体互作、活性氧清除和谷胱甘肽代谢等相关基因表达水平发生显著变化。同时,外源5-羟色胺亦可改善盐胁迫对拟南芥根系生长的抑制,与生长素在促进植物形态发生方面具有类似的功能,5-羟色胺诱导的初生根生长抑制效应是由茉莉酸乙烯和活性氧串扰的下游效应所介导^[13-14];而5-羟色胺介导的水稻对稻瘟病菌

(*Magnaporthe oryzae*)侵染的应激反应则主要受到光和脱落酸诱导^[15],表明5-羟色胺诱导激活植物生物和非生物胁迫缓解效应可能受到各类激素及环境刺激协同调控作用影响。然而,5-羟色胺在植物抗逆防御中具体的分子生理调控机制还需要深入研究。

蜡杨梅(*Myrica cerifera*)是一种小型常绿灌木,原产于美国东南部。由于其对盐碱土壤、低温、干旱和高水分环境等多种非生物胁迫的抗性,现已成为南方特色水果——杨梅(*Morella rubra*)的优良抗性砧木^[16-18]。然而,关于其抗旱性以及响应外源5-羟色胺的潜在分子生理机制尚不清楚。本研究基于转录组测序探讨模拟干旱胁迫下蜡杨梅幼苗根系响应外源5-羟色胺的分子生理机制,以为农业生产中利用化学调控策略提高植物抗旱性和培育抗逆性品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2021年2月在中国浙江省宁波市余姚(121°17'N, 29°59'E)采集健康的蜡杨梅(*Morella cerifera*)种子约1000粒直接播种于含有珍珠岩和泥炭(1:1, v/v)基质的营养钵中,置于温室直到发芽。在第二年收集生长势一致的幼苗,转移到含有半强度霍格兰氏溶液的塑料容器中进行水培。待水培稳定30 d后,参照文献^[19]中的操作方法,采用水培方式,分别配制特定组分及浓度的营养液以实施5-羟色胺(上海源叶生物科技有限公司)和聚乙二醇(PEG 6000, BBI生命科学有限公司)处理,具体包括对照组(无5-HT和PEG 6000)、A组(5% PEG 6000)、B组(10% PEG 6000)、C组(10% PEG 6000 + 50 μmol/L 5-HT)和D组(10% PEG 6000 + 100 μmol/L 5-HT)。每个处理含3次重复,5株苗为

一个重复。处理 48 h 后, 从每个处理中随机收集幼苗的须根, 经液氮中速冻后保存于 -80°C 冰箱备用。

1.2 植物激素水平及抗氧化酶活性测定

使用酶联免疫吸附法 (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) 测量植物须根中吲哚乙酸 (IAA, indole acetic acid)、赤霉素 (GA_3 , gibberellin A3)、脱落酸 (ABA, abscisic acid)、油菜素内酯 (BR, brassinolide) 和茉莉酸 (JA, jasmonic acid) 的含量, 具体操作方法参照文献 [19-20]。使用试剂盒 (苏州科铭生物技术有限公司) 测定植物抗氧化酶活性, 包括过氧化物酶 (POD, peroxidase)、超氧化物歧化酶 (SOD, superoxide dismutase)、丙二醛 (MDA, malondialdehyde)、过氧化氢酶 (CAT, catalase) 和过氧化氢 (H_2O_2)。所有测定结果均采用邓肯新复极差检验法进行显著性检验 ($P < 0.05$)。取幼苗须根, 用剪刀截取成长度约 1.0 cm 的小段, 参照文献 [21] 中操作方法进行 H2DCFDA 探针溶液孵育, 最后利用激光共聚焦显微镜 (Leica, TCS SPE II) 观察荧光差异并拍照。激光共聚焦显微镜基本参数设置: 激发光 488 nm, 发射光 530 nm。

1.3 转录组测序文库构建与测序分析

使用 RNAPrep Pure Plant Plus Kit 试剂盒 (天根生化科技有限公司) 从蜡杨梅须根组织中提取高质量的总 RNA, 通过 Gene Expression Sample Preparation 试剂盒构建测序文库。基于 Illumina HiSeq 4000 测序技术, 读取序列长度为 2×150 bp。测序获得原始序列文件可在 NCBI SRA 数据库中获取 (登录号: PRJNA768248, PRJNA913465)。使用 Trimmomatic 软件 [22] 去接头和低质量序列。利用 CLC Genomics Workbench 软件对序列质量评分 ≥ 30 的 clean reads 进行组装, 以杨梅基因组 (Bio Project 登录号: PRJNA398601) 为参考。

1.4 基因集富集分析与非生物胁迫核心通路映射

参照拟南芥基因组 (TAIR10) [23] GO 注释文件, 利用 CLC Genomics Workbench 软件中的 BLAST 组

件建立杨梅全基因组的基因集注释文件 (E 值 $1e-5$)。利用 OmicShare 在线分析云平台 (<https://www.omicshare.com/tools/>) 对不同处理的差异基因进行鉴定和基因集富集分析, 显著性阈值设置为 Normal P -value < 0.01 和错误发现率 (FDR, false discovery rate) < 0.05 。此外, 利用 MapMan 3.6.0 RC1 软件 (<http://mapman.gabipd.org/web/guest/mapman>) [24] 将差异基因映射至非生物胁迫核心通路。

1.5 加权基因共表达网络分析与 qRT-PCR 验证

使用 TBtools 软件 [25] 中的加权基因共表达网络分析 (WGCNA, weighted gene co-expression network analysis) shiny 插件进行加权基因共表达网络分析。参数设置 $\beta = 9$ (Scale-free $R^2 = 0.8$) 作为软阈值, 以构建无标度网络, 最小模块基因数量设置为 20。通过不同处理与基因表达之间的相关系数来评估模块与性状之间的相关性。将相关系数绝对值 > 0.75 且 $P < 0.001$ 的模块定义为显著性模块。最后, 通过 OmicShare 在线工具建立共表达网络, 权重参数值设置为 0.4。

随机选择 20 个基因进行 qRT-PCR 验证分析。使用前期 1.3 从蜡杨梅须根组织中提取的高质量总 RNA 并通过 M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit (上海生工生物工程股份有限公司) 合成第一链 cDNA, qRT-PCR 使用 ABI Q6 Flex Real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific) 和 2X SG Fast qPCR Master Mix (上海生工生物工程股份有限公司), 具体方法参照文献 [26]。上述 qRT-PCR 反应均采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法 [27] 评估基因表达水平, 扩增引物序列见表 1, 并以 *Actin* (GenBank: GQ340770) 作为内参基因 [28]。所有数据导出至 Microsoft Excel 365 (Microsoft), 通过 Data Processing System 软件 [29] 采用邓肯新复极差检验法进行显著性检验 ($P < 0.05$)。最后, 使用 OriginPro 9.0 (OriginLab) 绘制数据图表。

表 1 本研究中 qRT-PCR 所用扩增引物序列

Table 1 The amplified primer sequences used for qRT-PCR in this study

基因名称 Gene name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	基因名称 Gene name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
<i>PIN2-F</i>	TCAACGGTCGTGAGCCATT	<i>K21H1.5-F</i>	AAGGGCTCGTCTCTATCC
<i>PIN2-R</i>	GGCCGTGGGACTTACTGAAA	<i>K21H1.5-R</i>	TTGGCACAGCACAATCTTTTTC
<i>ARF-F</i>	CAAGCCCTGGAACATGTATCAC	<i>OSM34-F</i>	TGCACCTGTGGGAAAAGATG
<i>ARF-R</i>	TAAGCCCATTTCCAGCGTTT	<i>OSM34-R</i>	GTTGCAACAATATTGATCGGTCTTA
<i>NCED-F</i>	CGAAGACTGCAGACCCAAAAG	<i>F9E10.10-F</i>	GTGACTGTGGCGGGCTTCT
<i>NCED-R</i>	GGTAGACGCCGTTGATGCAT	<i>F9E10.10-R</i>	ACCCATCAACCAAAGAGATATCAA

表 1 (续)

基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
<i>SDR2-F</i>	GTGGAGCGGAGAAGGAACAG	<i>T28P6.2-F</i>	TTTGCCTGGAAGATGTGGAAT
<i>SDR2-R</i>	TGGACTCTTCGCTAGCCAAGA	<i>T28P6.2-R</i>	CACACACAGCAACGCCACTT
<i>PPPDE-F</i>	GGAGAGGGAGGCTCGTGAGT	<i>CRRLK-F</i>	TGCTTCAAATCCGGCCATAC
<i>PPPDE-R</i>	TTGTAGACATTCTTGCGGAATACC	<i>CRRLK-R</i>	TGAATCTGGACCAGCAGGAATA
<i>ERF-F</i>	AGTTTGC GCGGAGATACG	<i>WRKY42-F</i>	CAAAGGTGTGCCGAGGATATG
<i>ERF-R</i>	GACCCCGAAAGCGAAA	<i>WRKY42-R</i>	CATATTCGCCGCTGCTGAT
<i>SAG-F</i>	TGGGAGATCAGGCGACAA	<i>WRKY33-F</i>	GTTGGAGAGGACGAATTTGATCA
<i>SAG-R</i>	ATGCCTCGAGGGTCAATTC	<i>WRKY33-R</i>	AGCTGGAAAACCCCTCGTGTT
<i>COBL-F</i>	GTGGCGGCTGTAACATTGAA	<i>MYB45-F</i>	CTGGAGCTCCGTCGCCATA
<i>COBL-R</i>	GGCTTGAGCCCCTACTATGGA	<i>MYB45-R</i>	TCCTCCTCTTCTTGCCAAAC
<i>FTI-F</i>	CCAGCCAAGCCATGAAGAGT	<i>OMT-F</i>	AACGACGCGTTTCCGAATATAG
<i>FTI-R</i>	AACGTTGACCATGCACTTGTG	<i>OMT-R</i>	CGGAGGAACTGCCTCAAACA
<i>IRX9-F</i>	CTCCTGCGACCATCCAAC	Actin-F	AATGGAAGTGAATGGTCAAGGC
<i>IRX9-R</i>	CAAGCCTCCTGGGTGTCAA	Actin-R	TGCCAGATCTTCTCCATGTCATCCCA
<i>SCPL3-F</i>	CTTGTTTTCTCCGGCATTG		
<i>SCPL3-R</i>	GACTGGTTCGAGTCGCCTACA		

基因来源于杨梅 Y2012-145 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_003952965.2)

Gene were derived from *Morella rubra* 'Y2012-145' (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_003952965.2)

2 结果与分析

2.1 5-羟色胺对干旱胁迫下蜡杨梅根系抗氧化酶活性与激素水平的影响

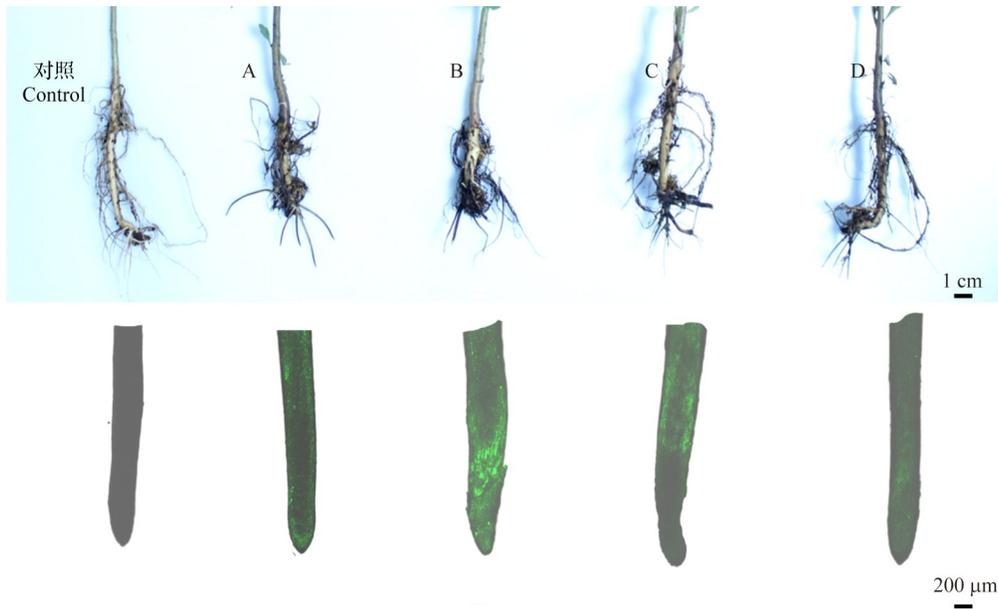
干旱胁迫下蜡杨梅幼苗根系颜色发生了不同程度的变化(图1)。与对照乳白色根相比,干旱胁迫及5-羟色胺处理下根系均发生了明显褐化。进一步利用激光共聚焦显微成像技术和活性氧特异荧光染料H₂DCFDA检测了干旱胁迫及5-羟色胺处理后蜡杨梅幼苗根系中活性氧的产生情况。结果显示,对照组根系中未检测到任何绿色信号,而B处理的绿色荧光信号明显强于其他处理,表明B处理可导致根系中积累高水平的活性氧。

由图2可知,与对照组相比,模拟干旱胁迫中B处理的过氧化物酶、过氧化氢酶活性以及丙二醛、过氧化氢积累水平发生显著变化。同时,与B处理相比,C和D组处理的超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量均显著升高,过氧化物酶和过氧化氢酶活性及过氧化氢积累水平则显著降低。由此可见,5-羟色胺处理有利于减轻活性氧的伤害,并且不同种类抗氧化酶对5-羟色胺的响应具有一定差异。此外,植物内源激素水平变化结果表明,相较于对照组,A和B组处理蜡杨梅根系中吲哚乙酸、脱落酸和油菜素内酯含量均显著提升,而赤霉素含量则显著降低

(图3)。同时,若以B处理为对照,则C处理显著提升了所有激素的含量水平,而D处理仅导致脱落酸和茉莉酸的含量显著降低,对其余3种激素含量则无显著性影响。因此,若以过氧化氢、丙二醛以及内源激素含量变化进行综合评价,则C处理所用的低浓度水平5-HT(50 μmol/L)可能更适宜用于缓解模拟干旱胁迫。

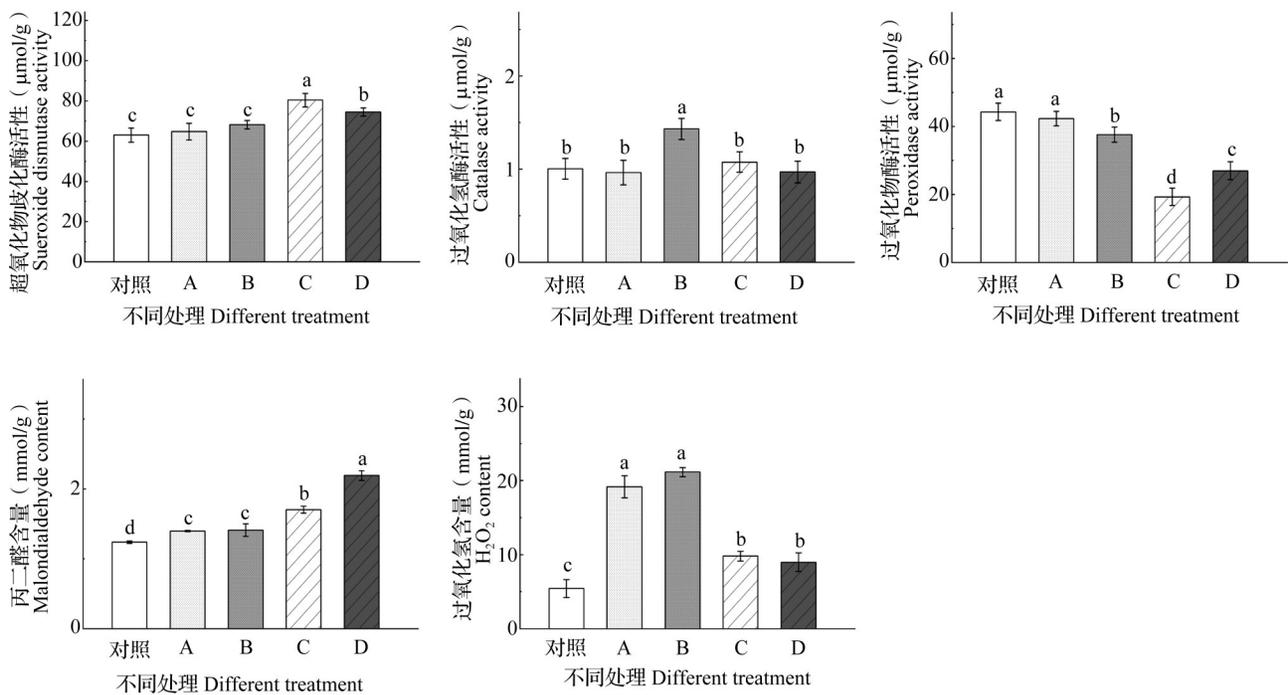
2.2 差异表达基因分析

共计构建了15个测序文库用于转录组测序,并分析模拟干旱胁迫和5-羟色胺处理对蜡杨梅根系中基因表达水平的影响。与对照组相比,A和B处理基因表达水平总体上呈现下调趋势(图4a)。然而,5-羟色胺处理后基因表达水平变化模式总体上则与之相反,大多数差异基因表达呈现上调模式。由此可见,相对于干旱胁迫条件下根系中大部分基因表达下调趋势,5-羟色胺处理则诱导基因总体呈现上调表达模式,这可能导致蜡杨梅根系对干旱胁迫的缓解效应。此外,5-羟色胺处理和干旱胁迫下蜡杨梅根系差异表达基因的GO富集可分为生物过程、细胞成分以及分子功能3大类功能(图4b)。在生物过程中,细胞过程、代谢过程和单生物过程的差异表达基因数量最多;在细胞成分中细胞、细胞组分和细胞器显著富集;在分子功能中主要在物质结合和催化活性中富集显著。



对照: 无 5-HT 和 PEG 6000, A: 5% PEG 6000, B: 10% PEG 6000, C: 10% PEG 6000+50 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT, D: 10% PEG 6000+100 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT; 绿色为 H2DCFDA 氧化产生的荧光; 下同

Control: No 5-HT and PEG 6000; Green is the fluorescence of H2DCFDA oxidation; The same as below
图 1 5-羟色胺处理与模拟干旱胁迫下蜡杨梅幼苗根系外观(上)及共聚焦荧光成像图(下)
Fig. 1 Appearance of seedlings root (top) and confocal fluorescence imaging (bottom)
in *M. cerifera* under 5-HT treatment and simulated drought stress



数据以平均数 \pm 标准差($n=3$)表示;采用Duncan检验单因素方差分析(ANOVA)评估显著性($P<0.05$),不同字母(a~d)表示差异显著;下同
 Data are presented as mean \pm SD ($n=3$); Analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) with Duncan's test ($P<0.05$), groups with different letters (a-d) are significantly difference; The same as below

图 2 5-羟色胺处理对模拟干旱胁迫下蜡杨梅幼苗根系中抗氧化酶活性的影响
Fig. 2 Activity and content of various enzymes in *M. cerifera* seedling roots under simulated drought stress and 5-HT treatment

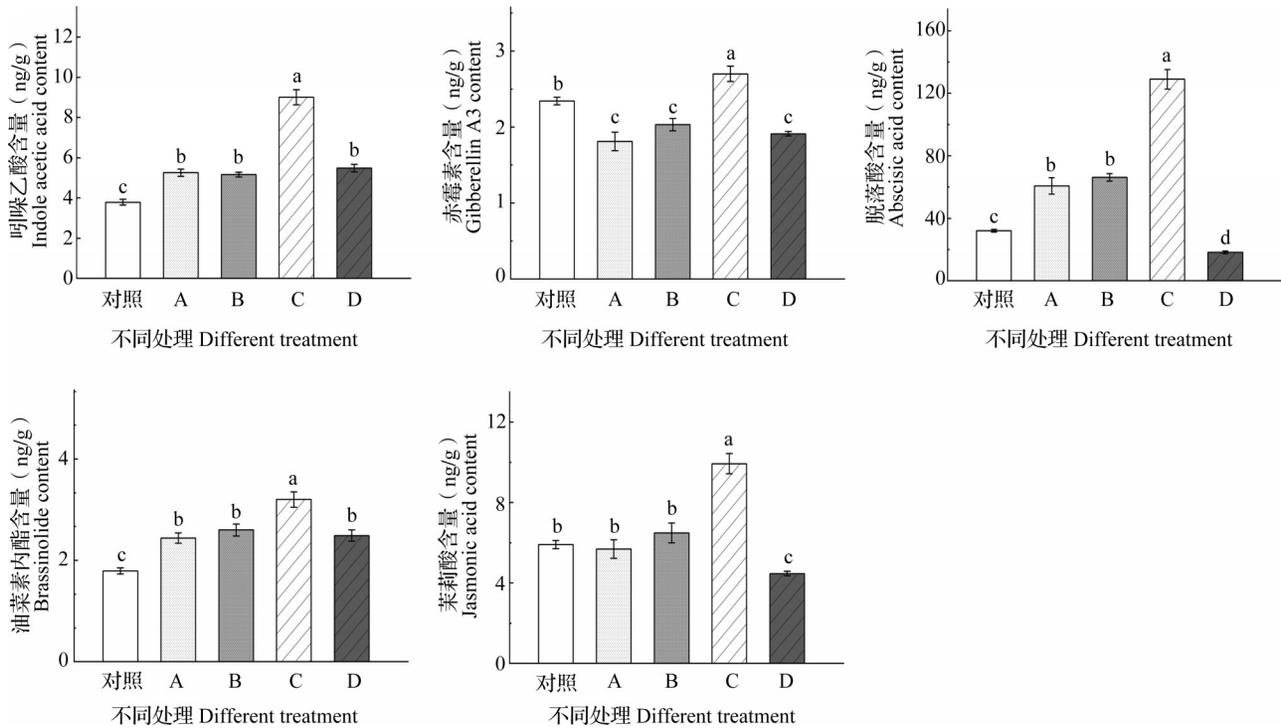


图3 5-羟色胺处理对模拟干旱胁迫下蜡杨梅幼苗根系内源激素水平的影响

Fig.3 Endogenous hormone levels in *M. cerifera* seedling roots under simulated drought stress and 5-HT treatment

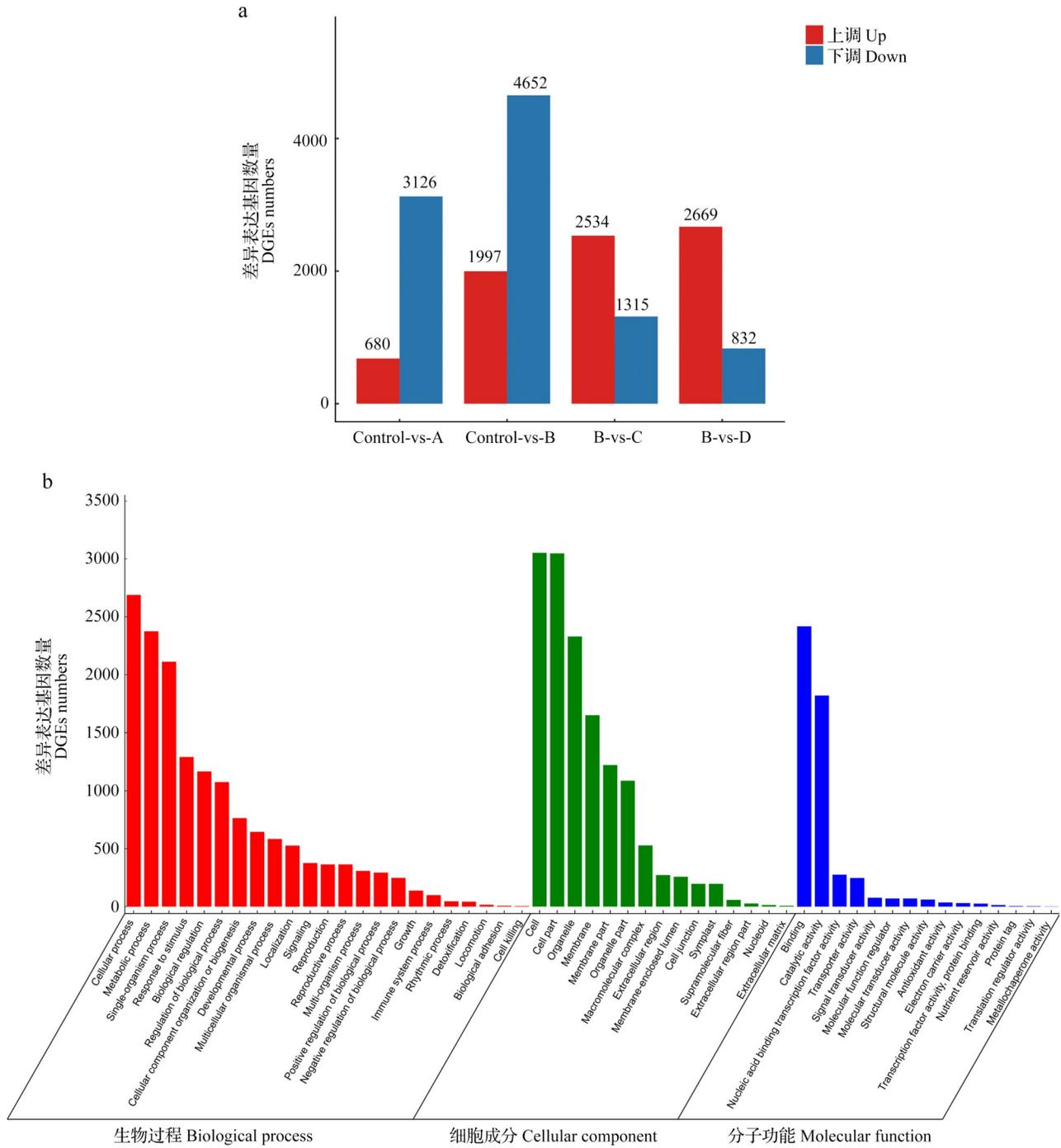
2.3 基因集富集分析

使用基因集富集工具筛选不同处理后差异表达变化达到显著性水平(错误发现率 q -value < 0.05 且 P -value < 0.01)的前 10 个基因集(图 5)。结果表明,不同浓度 PEG 6000 处理显著性富集获得的 TOP10 基因集均表现为下调模式(标准化富集分数 < 0,即为下调表达);同时,两种浓度 PEG 6000 处理后均未富集共有的基因集,这意味着根系在转录水平对于不同浓度 PEG 6000 的响应可能存在截然不同的分子调控途径。相反地,5-羟色胺处理后显著富集获得的基因集表达趋势总体上为上调(标准化富集分数 > 0,即为上调表达),并且鉴定出 5 个共有的基因集(GO: 0045491, GO: 0045492, GO: 0009834, GO: 0031225 和 GO: 0009698)。另外,PEG6000 和 5-羟色胺处理后显著富集到了涉及抗氧化活性(GO: 0016209)、氧化还原酶活性(GO: 0016682)、生长素介导信号传导(GO: 0010928)和赤霉素介导信号传导(GO: 0009740)基因集,它们作为响应 PEG 6000 和 5-羟

色胺处理的重要基因集,可能在应对干旱胁迫过程中发挥关键作用,但是尚需进一步验证。

2.4 与抗氧化酶活性及激素代谢相关的差异表达基因分析

通过基因集富集分析后,进一步对抗氧化活性及激素信号通路相关的高贡献目标基因进行筛选,在抗氧化活性基因集(GO: 0016209)中共筛选到 29 个高贡献目标基因(图 6),包括 19 个 *PER*、2 个 *DHAR* 以及 *GSTF13*、*ATGR1* 和 *RBOHF* 等,均为显著下调表达;相反地,在氧化还原酶活性基因集(GO: 0016682)中,共有 8 个基因显著上调表达(包括 5 个 *LAC*、*AOX1A*、*SRG1* 和 *IRX12*)。此外, TOP10 基因集中也富集到了涉及生长素和赤霉素介导信号传导通路的基因集(GO: 0010928 和 GO: 0009740),均为显著下调表达模式。其中,生长素介导信号传导通路中有 8 个高贡献目标基因(包括 3 个 *PIN*、2 个 *ABCB*、*MYB*、*GLIP* 和 *PILS*);而赤霉素介导信号传导通路则有 17 个高贡献目标基因,包括 *GA*、*LIP*、*RGA*、*MGP* 和 *ESR* 等。



A: X轴表示不同处理组的对比; B: Y轴中的阈值设置为 $|\log_2 \text{fold-change (FC)}| > 2, P < 0.05$

A: The comparison group category is on the X-axis; B: Threshold value of genes number is presented on the y-axis, with $|\log_2 \text{fold-change(FC)}| > 2, P < 0.05$

图4 5-羟色胺处理和模拟干旱胁迫下蜡杨梅的差异表达基因数量(a)和GO富集(b)

Fig. 4 Differentially expressed gene number (a) and GO enrichment (b) of *M. cerifera* under 5-HT treatment and simulated drought stress

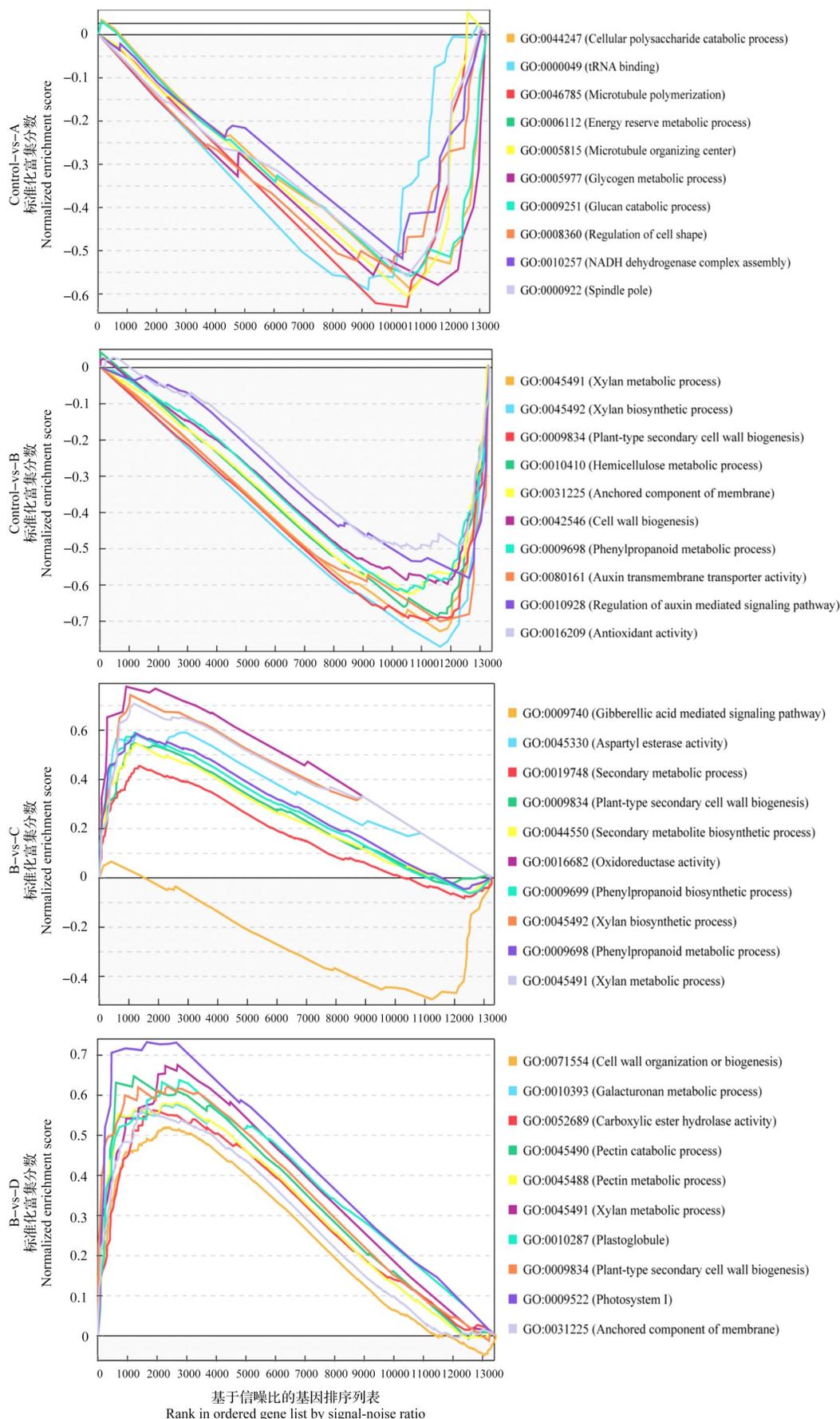
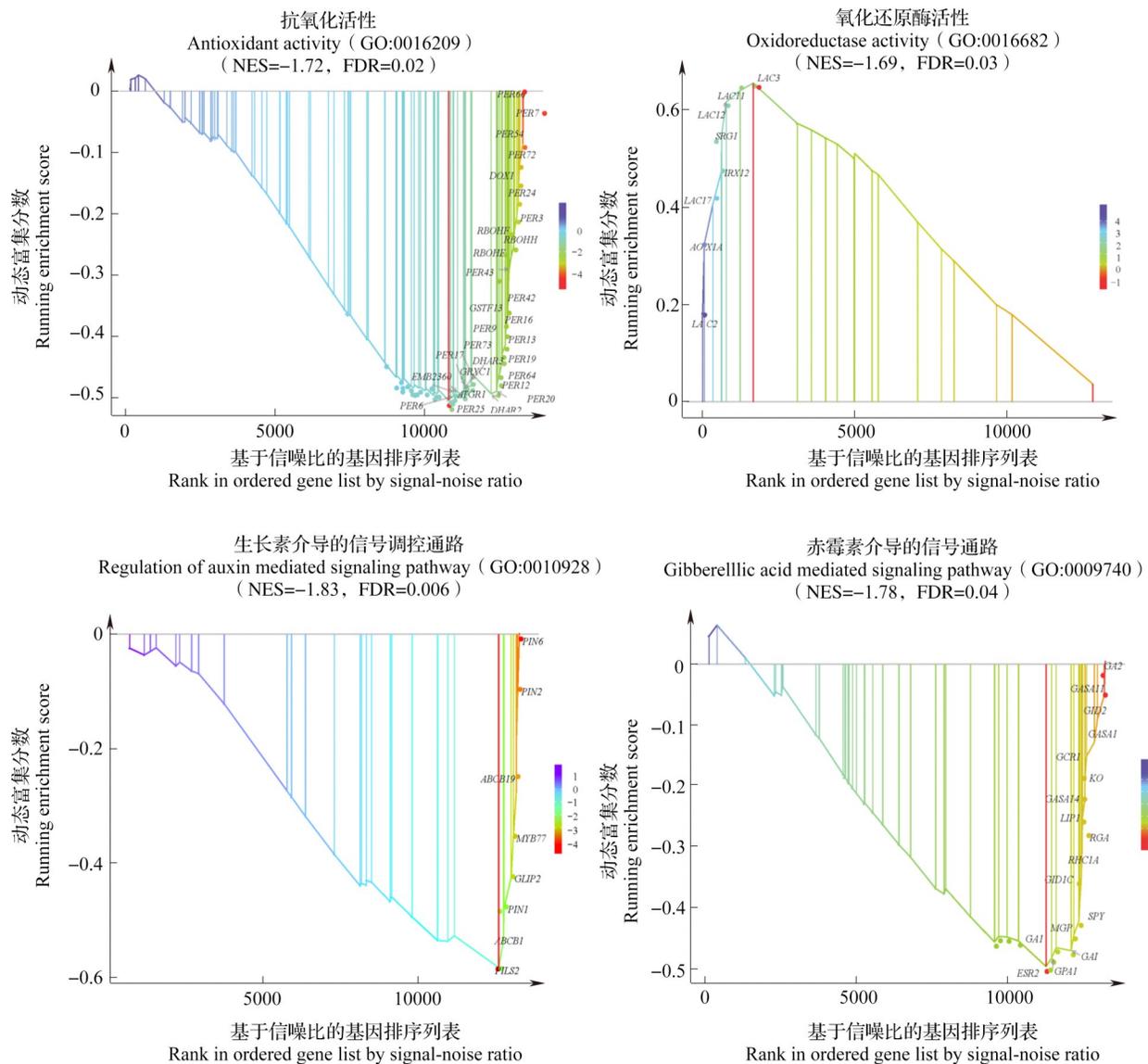


图5 蜡杨梅根系在模拟干旱胁迫下响应5-HT的基因集分析及GO注释

Fig. 5 GO-related terms of enriched gene sets associated with 5-HT and simulated drought stress in *M. cerifera*



上述抗氧化酶活性和激素介导信号传导 GO Terms 来源于图 5

The above antioxidant activity and hormone-mediated signaling GO Terms were derived from Figure 5

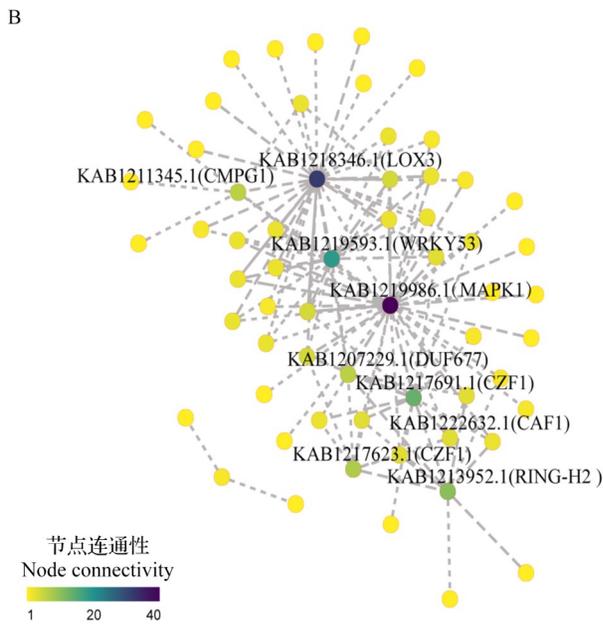
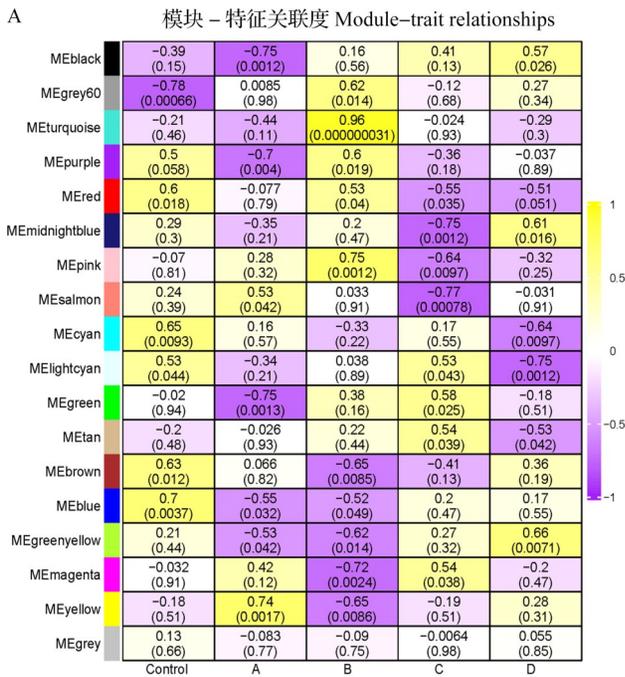
图 6 蜡杨梅根系响应干旱胁迫和 5-HT 处理中的抗氧化酶活性和激素介导信号传导关键基因点阵图

Fig. 6 The dot map of genes at the leading edge associated with 5-HT and drought stress in *M. cerifera* determined for antioxidant activity and hormone mediated signaling pathway

2.5 加权基因共表达网络分析

建立加权基因共表达网络来评估差异表达基因与不同处理之间的相关性(图 7)。首先,在每个处理中共鉴定获得 18 个共表达模块(图 7A),其中 8 个模块与处理之间的相关性达到显著性阈值(模块-特征关联度 ≥ 0.75 , $P < 0.01$)。其中 A 处理中,黑色和绿色模块与处理 A 相关性呈现为显著负相关(模块-特征关联度 $= -0.75$, $P < 0.01$),而 B 处理中不存在上述模块,这意味着蜡杨梅根系对不同浓度的干旱胁迫处理(PEG6000)的响应具有一定差异。对上述 8 个显著性相关的共表达的基因模块进行过滤(软阈值 > 0.4),并且将共表达网络可视化,进一步鉴定共表达网络

中的枢纽基因。通过以上模块共筛选出 9 个枢纽基因,即 *KAB1219986.1* (*MAPK1*)、*KAB1218346.1* (*LOX3*)、*KAB1219593.1* (*WRKY53*)、*KAB1217691.1* (*CZF1*)、*KAB1211345.1* (*CMPG1*)、*KAB1207229.1* (*DUF677*)、*KAB1222632.1* (*CAF1*)、*KAB1213952.1* (*RING-H2*)和 *KAB1217623.1* (*CAF1*),它们作为脂氧合酶 LOX3、WRKY、CZF1 等转录因子家族成员,主要参与激素代谢和转录调控过程(图 7B,其具体功能注释参见 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_003952965.2/)。总之,上述枢纽基因可能在干旱胁迫和 5-羟色胺处理下蜡杨梅的根系中发挥重要作用,可作为后续研究的关键靶点。



A: 不同处理间蜡杨梅根系中差异表达基因的相关分析热图。相关系数列于每个方格中,其相关性的P值列于括号中;B: 干旱胁迫与5-羟色胺处理后蜡杨梅的响应枢纽基因及其表达权重网络图。基因被标记为节点圈,其颜色代表连通性强度

A: Heatmap of the correlation analysis between different treatments and DEGs in *M. cerifera*. The correlation coefficients are presented in each square and the P-value of the correlation is in parenthesis;

B: Interaction of the gene co-expression network of the hub genes in *M. cerifera* with 5-HT treatment under drought stress and were displayed through the weight network diagram. These genes are marked as node circles and the color is representative of their connectivity

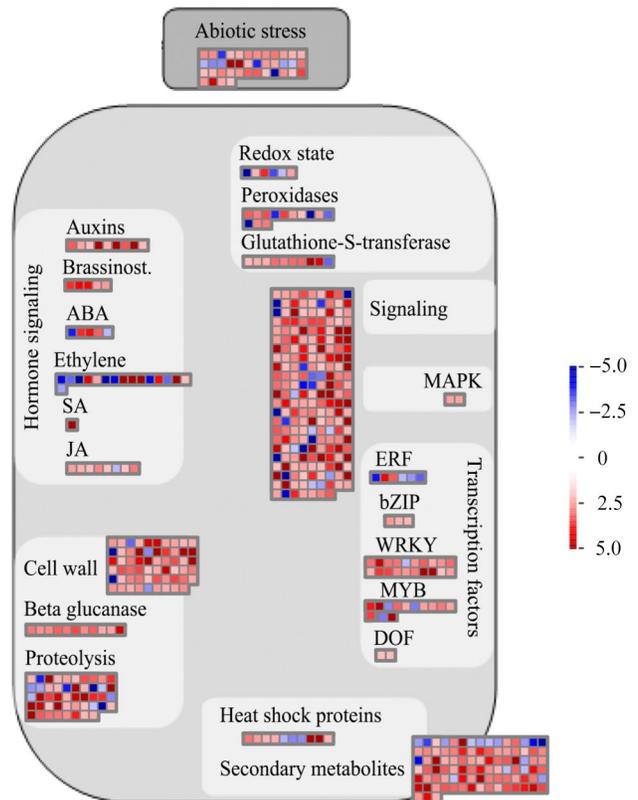
图7 干旱胁迫和5-羟色胺处理下蜡杨梅根系差异表达基因

WGCNA分析

Fig.7 WGCNA of DEGs in *M. cerifera* with 5-HT treatment under drought stress

2.6 非生物胁迫核心途径映射分析与qRT-PCR验证

使用MapMan软件将差异表达基因(C处理)映射至非生物胁迫核心途径图中,共计映射585个基因(图8)。由于50 μM浓度的5-HT对模拟干旱胁迫的缓解效果综合评价为最佳,并且该处理的差异表达基因总体呈上调趋势,表明外源5-羟色胺可能在转录水平上正向驱动根系对于干旱胁迫的缓解效应。上述基因大多数位于信号传导、细胞壁、次级代谢物和蛋白质水解这4个生物途径中。相反地,仅有少量基因映射于SA、MAPK、bZIP和DOF型锌指蛋白。因此,基于本研究结果推测5-羟色胺主要通过诱导PER、PIN、WRKY、LOX等关键基因表达,进而作用于相关靶向因子,发挥增强抗氧化酶的活性和活性氧清除能力及生长素等内源激素代谢水平,最终助力于根系抗旱性的提升(图9)。由此,随机选取20个基因进行qRT-PCR验证分析



红色和蓝色分别代表基因上调和下调表达

The red and blue colors represent up and down-regulated genes, respectively

图8 5-羟色胺(50 μmol/L)缓解蜡杨梅根系干旱胁迫的非生物胁迫核心途径

Fig.8 Core pathway of the abiotic stress for 5-HT (50 μM) alleviates drought stress in the root system of *M. cerifera*

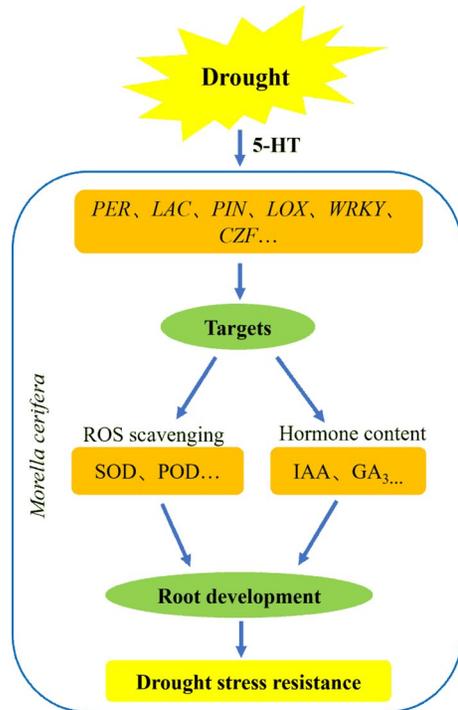


图 9 干旱胁迫下蜡杨梅根系响应 5-羟色胺处理的分子生理作用模型

Fig. 9 A proposed model for molecular and physiological of root in *M. cerifera* under drought stress response to 5-hydroxytryptamine (5-HT) treatment

(表 1), 这些基因主要参与激素代谢(吲哚乙酸、赤霉素和水杨酸)、细胞壁半纤维素合成、信号受体激酶和次生代谢过程。最终, qRT-PCR 结果显示上述基因参与了 5-羟色胺处理的响应过程, 并发生了不同程度的差异表达变化(图 10)。

3 讨论

干旱是一种严重的环境胁迫, 对植物生长和产量构成重大威胁, 也限制了全世界的农业生产。前期研究针对植物干旱胁迫相关的表型性状和转录组进行了广泛的分析^[30-32], 较少涉及植物生长调节剂(5-羟色胺)缓解干旱胁迫的潜在分子生理机制。前期研究表明, 干旱胁迫会诱导激活氧化应激反应, 特别是活性氧和其他自由基水平的升高, 将导致细胞损伤, 促使须根外部形态表现为颜色加深^[33], 本研究也证实了这一结论, 可在后续相关研究中以此作为判断须根损伤程度的主要外观指标之一。与对照相比, 本研究中 PEG 6000 (A 处理) 模拟干旱胁迫下蜡杨梅根系的超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶活性并未发生显著性变化(图 2), 这与相关研究报道有一定差异^[34], 可能是由于本研究中模拟干旱处理的 PEG 6000 浓度较低, 不足以长时间启动及维持超氧化物歧化酶等抗氧化酶保护机制; 事实上, 植物在胁迫条件下的抗氧化酶活性呈现为动态变化趋势, 并非保持一成不变的升高或者降低模式, 这有待于进一步研究。前期研究发现 5-羟色胺具有广谱的抗氧化能力(超过抗坏血酸和生育酚)和内源性自由基清除作用, 进而在缓解植物非生物胁迫过程中发挥关键作用^[11]。本研究亦证实了这一论点, 5-羟色胺显著提升了蜡杨梅根系中超氧化物歧化酶活性(图 2), 加速清除细胞中的活性氧, 进而有效地维持生物膜结构和功能

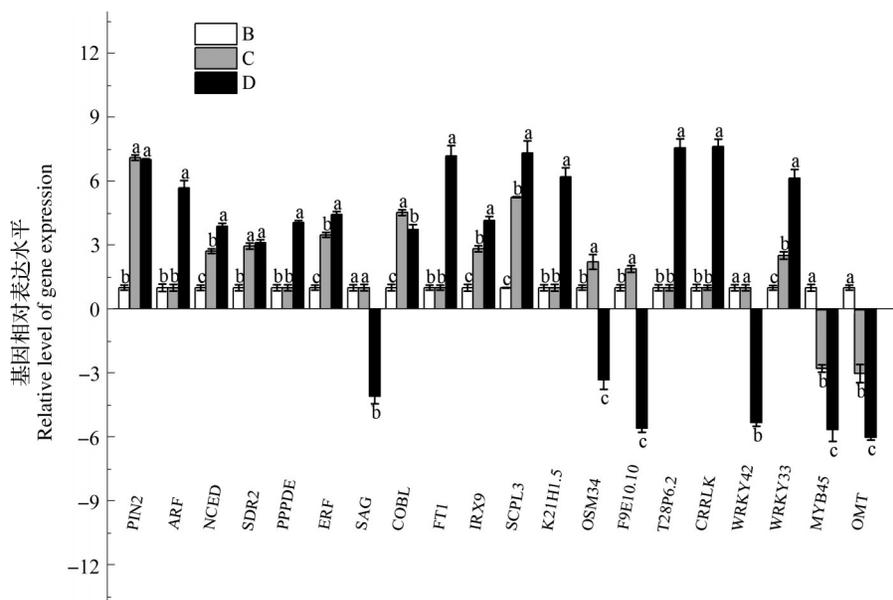


图 10 蜡杨梅中 20 个基因的 qRT-PCR 验证分析

Fig. 10 qRT-PCR validation analysis of 20 genes in *M. cerifera*

的稳定性。然而,5-羟色胺处理显著提升了根系中的丙二醛含量,其作为膜脂过氧化程度的指标,可能也存在类似于活性氧的逆向信号应答机制^[35],参与对胁迫环境的响应,其积累水平变化可能会调控植物对脱落酸等逆境激素的反应,这需要进一步鉴定。另外,本研究中50 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT处理导致所测5种内源激素含量显著提升,而100 $\mu\text{mol/L}$ 的5-HT处理后脱落酸和茉莉酸含量则显著降低,这意味着干旱胁迫下蜡杨梅根系对5-羟色胺的响应存在剂量依赖性。类似研究表明,外源5-羟色胺促进拟南芥侧根发育具有浓度差异依赖性^[36],即浓度越高,促进作用越弱,这或许是由于5-羟色胺和植物生长素在结构上的相似性,以致两者在促进植物生长发育以及对环境胁迫的响应也存在类似的极性效应。然而,目前植物中5-羟色胺细胞水平上浓度差异反应内在机理尚不清楚。此外,与本研究结果类似,5-羟色胺参与调节脱落酸的积累及转化,对应激条件下的组织解毒和自由基平衡具有调节作用;也可通过茉莉酸途径对拟南芥根系生长发挥调控作用^[13]。综上所述,5-羟色胺诱导应激反应涉及活性氧、吲哚乙酸、脱落酸和茉莉酸的相互作用协同调控,其潜在分子生理响应机制较为复杂。

关于5-羟色胺在转录水平驱动植物逆境防御过程方面的内在机制尚未明确。通过基因集富集分析筛选到19个下调表达的高贡献目标基因 PER (GO:0016209), PER 作为大基因家族,主要参与调控植物抗氧化系统以及木质素积累^[37-38],上述筛选获得的 PER 基因家族成员在蜡杨梅根系中的具体功能及作用还有待后续深入研究。另外,Niu等^[39]研究表明,胡杨中的40个 $PeuLAC$ 家族基因存在广泛的功能冗余,仅发现 $PeuLAC2$ 过表达可以促进木质部细胞次生壁厚度增厚、木质部导管数量显著增加、导管总面积增大,增强干旱胁迫下胡杨的抗氧化酶活性、降低活性氧含量,从而提升其抗旱能力。据此推测,本研究中显著富集获得的基因集GO:0016682(50 $\mu\text{mol/L}$ 的5-HT处理)包含5个上调表达的 LAC 基因,可能对抗氧化及缓解干旱胁迫发挥正向贡献作用,将作为后期功能验证分析的重要靶基因之一。此外,GSEA分析结果中富集到多个关键基因集,涉及细胞壁代谢(GO:0071554)、次生细胞壁发育(GO:0009834)、木聚糖生物合成(GO:0045491)和果胶代谢(GO:0045488)上调。众所周知,木葡聚糖、木聚糖(半纤维素)和果胶是植物细胞壁形成稳定网络结构的主要成分^[40-41]。与5-羟色

胺具有结构相似性和共同的生物合成前体(L-色氨酸)的激素——褪黑素,也具有类似的作用,它可以激活纤维素、果胶和木聚糖的合成和降解过程,用于响应盐胁迫防御反应^[42]。同时,褪黑激素还能激活纤维素、果胶和木聚糖的代谢过程,参与应对温度胁迫^[43-44]。因此,5-羟色胺应对干旱胁迫的缓解效应可能与稳定细胞壁结构组分及代谢过程关系密切,尚需要进一步鉴定。进一步的,基于加权基因共表达网络分析结果鉴定出多个枢纽基因。其中,植物免疫应答信号分子 $LOX3$ ($KAB1218346.1$)主要介导茉莉酸生物合成,强化植物对不同环境条件的适应性,相关研究表明,其在植物生长发育、果实成熟老化、胁迫应答中发挥重要作用^[45]。类似地, $CaLOX1$ 和 $DkLOX3$ 通过调节拟南芥中脱落酸合成、脂质过氧化和活性氧的产生,共同参与干旱和高盐的非生物胁迫抗性^[46];同时,外源性 LOX 可直接诱导组织细胞中内源性茉莉酸浓度的积累,而高盐胁迫、干旱、过氧化氢、脱落酸和茉莉酸均可激活水稻锌指蛋白基因($OsTZF1$)的表达,通过正向调节水稻对高盐和干旱胁迫的耐受性,并作为水稻叶片衰老的负调控因子在许多细胞功能中发挥重要作用^[47]。两个ZF1枢纽基因($KAB1217623.1$ 和 $KAB1217691.1$)在结构上都属于“C3H”类锌指蛋白,通常定位于细胞核中,发挥转录调控作用,这意味着上述两个 $CZF1$ 基因可能通过在细胞核内控制应激应答基因的RNA代谢,进而响应模拟干旱胁迫和5-羟色胺处理。然而,上述基因的特异功能必须通过遗传转化来验证。5-羟色胺处理诱导多种转录因子表达差异变化,包括ERF、MYB、WRKY和bZIP等,其中大部分转录因子呈现为上调的表达模式。与其类似地,多数研究报道表明上述转录因子普遍参与植物逆境应答过程^[48-49],但其确切的生物学功能尚不完全清楚。

综上所述,5-羟色胺在调控植物生长发育与适应环境胁迫中发挥重要作用。本研究表明5-羟色胺可能通过增强抗氧化作用、激素调节和激活细胞壁代谢等途径参与了蜡杨梅根系对模拟干旱胁迫的响应过程,为进一步阐明5-羟色胺在植物中的分子调控机制提供了前期基础。然而,其内在的分子生理调控机制尚不完全清楚。因此,后续对5-羟色胺的研究应集中在以下几个方面:(1)确定5-羟色胺在植物中的组织差异性和转运途径;(2)阐明5-羟色胺的信号转导途径和调控机制;(3)评估其作为生长调节剂在农业生产上的应用效果。

参考文献

- [1] 王硕, 贾潇倩, 何璐, 李浩然, 王红光, 何建宁, 李东晓, 房琴, 李瑞奇. 作物对于干旱胁迫的响应机制及提高作物抗旱能力的调控措施研究进展. 中国农学通报, 2022, 38(29):31-44
Wang S, Jia X Q, He L, Li H R, Wang H G, He J N, Li D X, Fang Q, Li R Q. Response mechanism of crops to drought stress and measures for improving drought resistance of crops: Research progress. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(29):31-44
- [2] Fadji A E, Santoyo G, Yadav A N, Babalola O O. Efforts towards overcoming drought stress in crops: Revisiting the mechanisms employed by plant growth-promoting bacteria. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 962427
- [3] Arnao M B, Hernández-Ruiz J. Melatonin: Synthesis from tryptophan and its role in higher plant. Amino acids in higher plants. Wallingford UK: CAB International, 2015:390-435
- [4] Wang X N, Zhang J C, Zhang H Y, Wang X F, You C X. Ectopic expression of *MmSERT*, a mouse serotonin transporter gene, regulates salt tolerance and ABA sensitivity in apple and *Arabidopsis*. Plant Physiology and Biochemistry, 2023, 197: 107627
- [5] Meade E, Hehir S, Rowan N, Garvey M. Mycotherapy: Potential of fungal bioactives for the treatment of mental health disorders and morbidities of chronic pain. Journal of Fungi, 2022, 8(3): 290
- [6] Erland L A E, Turi C E, Saxena P K. Serotonin, Canada: Elsevier Academic Press, 2019: 23-46
- [7] 田姗姗, 李继强, 邹锡玲, 张学昆, 付桂萍, 吕燕, 曾柳, 闫蕾, 刘月, 钟燕, 杨静, 陈建军, 马海清, 程勇. 5-羟色胺对油菜幼苗干旱的缓解效应. 中国油料作物学报, 2019, 41(2): 192
Tian S S, Li J Q, Zou X L, Zheng X K, Fu G P, Lv Y, Zeng L, Yan L, Liu Y, Zhong Y, Yang J, Chen J J, Ma H Q, Cheng Y. Effect of exogenous 5-hydroxy-tryptamine (5-HT) on rape (*Brassica napus* L.) seedling under drought stress. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2019, 41(2): 192
- [8] He H, Lei Y, Yi Z, Raza A, Zeng L, Yan L, Ding X Y, Yong C, Zhou X L. Study on the mechanism of exogenous serotonin improving cold tolerance of rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings. Plant Growth Regulation, 2021, 94: 161-170
- [9] Pelagio-Flores R, Ortíz-Castro R, Méndez-Bravo A, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J. Serotonin, a tryptophan-derived signal conserved in plants and animals, regulates root system architecture probably acting as a natural auxin inhibitor in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiology, 2011, 52(3): 490-508
- [10] Abbasi B H, Younas M, Anjum S, Ahmad N, Ali M, Fazal H, Hano C. Signaling and communication in Plants. Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, 2020: 75-92
- [11] Ravishankar G A, Ramakrishna A. Serotonin and melatonin: Their functional role in plants, food, phytomedicine, and human health. CRC Press. (2016-11-28)[2023-11-20]. <https://www.researchgate.net/publication/311313850>
- [12] Wan J, Zhang P, Wang R, Sun L, Ju Q, Xu J. Comparative physiological responses and transcriptome analysis reveal the roles of melatonin and serotonin in regulating growth and metabolism in *Arabidopsis*. BMC Plant Biology, 2018, 18: 362
- [13] Mukherjee S. Novel perspectives on the molecular crosstalk mechanisms of serotonin and melatonin in plants. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 132: 33-45
- [14] Pelagio-Flores R, Ruiz-Herrera L F, Lopez-Bucio J. Serotonin modulates *Arabidopsis* root growth via changes in reactive oxygen species and jasmonic acid-ethylene signaling. Physiologia Plantarum, 2016, 158(1): 92-105
- [15] Hayashi K, Fujita Y, Ashizawa T, Suzuki F, Nagamura Y, Hayano-Saito Y. Serotonin attenuates biotic stress and leads to lesion browning caused by a hypersensitive response to *Magnaporthe oryzae* penetration in rice. Plant Journal, 2016, 85(1): 46-56
- [16] Oberle B, OliviaCole P, Frank G, Gates A, Hall B, Harvey D, Scott M E, Setterberg C, Bustetter S P. Multilevel allometric growth equations improve accuracy of carbon monitoring during forest restoration. Trees, Forests and People, 2023, 14: 100442
- [17] 汪国云, 陈炯怡, 赵岚, 赵海波, 李雨珊, 周超超, 焦云, 高中山. 蜡杨梅砧木资源利用现状和前景. 果树资源学报, 2022, 3(1):1-6
Wang G Y, Chen J Y, Zhao L, Zhao H B, Li Y S, Zhou C C, Jiao Y, Gao Z S. Application status and prospect of wax bayberry as rootstock for Chinese bayberry. Journal of Fruit Resources, 2022, 3(1):1-6
- [18] Knox G. Drought-tolerant plants for north and central florida. Florida: University of Florida Cooperative Extension Service, 2005: 1-19
- [19] Jiao Y, Sha C, Xie R, Shu Q. Comparative analysis of the potential physiological and molecular mechanisms involved in the response to root zone hypoxia in two rootstock seedlings of the Chinese bayberry via transcriptomic analysis. Functional & Integrative Genomics, 2023, 23(1): 11
- [20] Xie R, Zheng L, Jiao Y, Huang X. Understanding physiological and molecular mechanisms of citrus rootstock seedlings in response to root zone hypoxia by RNA-Seq. Environmental and Experimental Botany, 2021, 192: 104647
- [21] 胡海涛, 钱婷婷, 杨玲. 基于H2DCFDA荧光探针的植物活性氧检测方法. 植物学报, 2022, 57(3): 320-326
Hu H T, Qian T T, Yang L. Detection of reactive oxygen species using H2DCFDA probe in plant. Chinese Bulletin of Botany, 2022, 57(3): 320-326
- [22] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120
- [23] Lamesch P, Berardini T Z, Li D, Swarbreck D, Wilks C,

- Sasidharan R, Muller R, Dreher K, Alexander D L, Garcia-Hernandez M. The Arabidopsis information resource (TAIR): Improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(D1): D1202-D1210
- [24] Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller L A, Rhee SY, Stitt M. MAPMAN: A user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal*, 2004, 37(6): 914-939
- [25] Chen C, Chen H, Zhang Y, Thomas H R, Frank M H, He Y, Xia R. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202
- [26] 李艳肖, 张春兰, 徐兴源, 陈艳秋, 向殿军, 刘鹏. 基于转录组学的蓖麻耐盐基因的挖掘. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(6): 1778-1793
- Li Y X, Zhang C L, Xu X Y, Chen Y Q, Xiang D J, Liu P. Transcriptomics-assisted mining of salt-tolerant genes in *Ricinus communis*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(6): 1778-1793
- [27] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [28] Niu S S, Xu C J, Zhang W S, Zhang B, Li X, Wang K L, Ferguson I B, Allan A C, Chen K S. Coordinated regulation of anthocyanin biosynthesis in Chinese bayberry (*Myrica rubra*) fruit by a R2R3 MYB transcription factor. *Planta*, 2010, 231: 887-899
- [29] Tang Q Y, Zhang C X. Data Processing System (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Science*, 2013, 20(2): 254-260
- [30] 王晓娟, 李娜, 姚文强, 杨立中, 王文奇. 树木抗旱生理特性及转录组调控研究进展. *内蒙古农业大学学报: 自然科学版*, 2023, 44(5): 81-88
- Wang X J, Li N, Yao W Q, Yang L Z, Wang W Q. Advances in drought resistance physiological characteristics and transcriptome regulation of trees. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University: Natural Science Edition*, 2023, 44(5): 81-88
- [31] Wang B, Liu C, Zhang D, He C, Zhang J, Li Z. Effects of maize organ-specific drought stress response on yields from transcriptome analysis. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 1-19
- [32] Ngara R, Goche T, Swanevelder D Z, Chivasa S. Sorghum's whole-plant transcriptome and proteome responses to drought stress: A review. *Life*, 2021, 11(7): 704
- [33] 卫星, 王政权, 张国珍. 干旱胁迫下水曲柳苗木细根线粒体的形态及活性变化. *植物生态学报*, 2010, 34(12): 1454-1462
- Wei X, Wang Z Q, Zhang G Z. Morphological and activity variation of mitochondria in fine roots of *Fraxinus mandshurica* seedling under drought stress. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2010, 34(12): 1454-1462
- [34] 梅映学, 魏玮, 张诗婉, 张韞璐, 王金缘, 王茜, 苏昕, 马莲菊. 干旱锻炼对盐胁迫下水稻幼苗根系抗氧化酶活性的影响. *浙江农业学报*, 2016, 28(8): 1304-1308
- Mei Y X, Wei W, Zhang S W, Zhang Y L, Wang J Y, Wang Q, Su X, Ma L J. Effect of PEG pretreatment on antioxidant enzymes activity under salt stress in root of rice seedling. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2016, 28(8): 1304-1308
- [35] Mittler R, Zandalinas S I, Fichman Y, Van Breusegem F. Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23: 663-679
- [36] Erland L A E, Turi C E, Saxena P K. Serotonin: An ancient molecule and an important regulator of plant processes. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(8): 1347-1361
- [37] 张国芹, 牟建梅, 陈虎根. 黄秋葵果实质地变化的生化和转录组联合分析. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(1): 282-295
- Zhang G Q, Mou J M, Chen H G. Combined biochemical and transcriptomic analysis of the Okra fruit texture Changes. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(1): 282-295
- [38] Guo T L, Liu C H, Meng F X, Hu L, Fu X M, Yang Z H, Wang N, Jiang Q, Zhang X Z, Ma F W. The m6A reader MhYTP2 regulates *MdMLO19* mRNA stability and antioxidant genes translation efficiency conferring powdery mildew resistance in apple. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(3): 511-525
- [39] Niu Z M, Li G T, Hu H Y, Lv J J, Zheng Q W, Liu J Q, Wan D S. A gene that underwent adaptive evolution, *LAC2* (*LACCASE*), in *Populus euphratica* improves drought tolerance by improving water transport capacity. *Horticulture Research*, 2021, 8: 88
- [40] 杨帅, 高尚珠, 卢晗, 詹亚光, 曾凡锁. 植物细胞壁形成及在非生物胁迫中的作用. *植物生理学报*, 2023, 59(7): 1251-1264
- Yang S, Gao S Z, Lu H, Zhan Y G, Zeng F S. Plant cell wall development and its function in abiotic stress. *Plant Physiology Journal*, 2023, 59(7): 1251-1264
- [41] 陈东滨, 王茜茜, 孙智仪, 杨小英, 傅经效, 郭新梅, 宋希云. 玉米 *ZmXTH23* 的克隆、表达及其对盐胁迫和干旱胁迫的响应. *农业生物技术学报*, 2019, 27(9): 1533-1541
- Chen D B, Wang Q Q, Sun Z Y, Yang X Y, Fu J X, Guo X M, Song X Y. Cloning and Expression of *ZmXTH23* in maize (*Zea mays*) and its response to salt and drought stress. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, 27(9): 1533-1541
- [42] Wei W, Li Q T, Chu Y N, Reiter R J, Yu X M, Zhu D H, Zhang W K, Ma B, Lin Q, Zhang J S. Melatonin enhances plant growth and abiotic stress tolerance in soybean plants. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(3): 695-707
- [43] Raza A, Charagh S, García-Caparrós P, Rahman M A, Ogwugwa V H, Saeed F, Jin W. Melatonin-mediated temperature stress tolerance in plants. *GM Crops & Food*, 2022, 13(1): 196-217

- [44] Kumar R, Bohra A, Pandey A K, Pandey M K, Kumar A. Metabolomics for plant improvement: Status and prospects. *Front Plant Science*, 2017, 8: 1302
- [45] Xing Q, Zhang X, Li Y, Shao Q, Cao S, Wang F, Qi H. The lipoxygenase *CmLOX13* from oriental melon enhanced severe drought tolerance via regulating ABA accumulation and stomatal closure in *Arabidopsis*. *Environmental and Experimental Botany*, 2019, 167: 103815
- [46] Zhang Y, Wang K, Wang Z, Li X, Li M, Zhu F, Majeed Z, Lan X, Guan Q. The lipoxygenase gene *AfLOX4* of *Amorpha fruticosa* L. is a potential regulator of drought stress tolerance pathways under saline and alkaline conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2023, 45(6): 72
- [47] Jan A, Maruyama K, Todaka D, Kidokoro S, Abo M, Yoshimura E, Shinozaki K, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K. OsTZF1, a C3H-Tandem zinc finger protein, confers delayed senescence and stress tolerance in rice by regulating stress-related genes. *Plant Physiology*, 2013, 161(3): 1202-1216
- [48] 兰孟焦, 后猛, 肖满秋, 李臣, 潘皓, 张允刚, 卢凌志, 侯隆英, 葛瑞华, 吴问胜, 李强. AP2/ERF 转录因子参与植物次生代谢和逆境胁迫响应的研究进展. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(5): 1223-1235
- Lan M J, Hou M, Xiao M Q, Li C, Pan H, Zhang Y G, Lu L Z, Hou L Y, Ge R H, Wu W S, Li Q. Research progress of AP2/ERF transcription factors participating in plant secondary metabolism and stress response. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(5): 1223-1235
- [49] 陈林英, 李李佳, 王博, 杜婉清, 高梦雪, 刘慧, 檀淑琴, 邱丽娟, 王晓波. WRKY 转录因子在大豆响应生物和非生物胁迫中的功能研究进展. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(2): 323-332
- Chen L Y, Li J J, Wang B, Du W Q, Gao M X, Liu H, Tan S Q, Qiu L J, Wang X B. Research progress on the function of WRKY transcription factor response to biotic and abiotic stresses in soybean. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(2): 323-332